

単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* を用いた化学物質の多元的生態毒性評価に関する研究

著者	田中 仁志
号	3445
発行年	2004
URL	http://hdl.handle.net/10097/8717

氏 名	たなか ひとし 田 中 仁 志
授 与 学 位	博士 (工学)
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の根拠法規	学位規則第 4 条第 1 項
研究科, 専攻の名称	東北大学大学院工学研究科 (博士課程) 土木工学専攻
学 位 論 文 題 目	単細胞緑藻 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> を用いた化学物質の多元的生態毒性評価に関する研究
指 導 教 員	東北大学教授 西村 修
論 文 審 査 委 員	主査 東北大学教授 西村 修 東北大学教授 野池 達也 東北大学教授 大村 達夫 東北大学助教授 中野 和典

論 文 内 容 要 旨

近年, 水質はそれほど悪くないが, 以前見られた水生生物が少なくなったと全国各地で言われている。また, 現在 10 万種類類の化学物質が使われているとされているが, 実際に環境中から様々な化学物質が検出されており, それらの水圏生態系への影響が危惧されている。わが国においても, 近年改正された化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律 (化審法) では, 新しく使用される化学物質に対して生態毒性試験の実施が義務づけられた。

また, 環境水中に排出された化学物質については, その全ての機器分析による把握は事実上困難であり, 水生生物の生育・生息環境として健全であるかどうかという観点から水質を総合的に評価するためにはバイオアッセイが有効である。さらに, 生物によって化学物質に対する感受性が異なることから, 複数のバイオアッセイを組み合わせる多元的な評価の必要性が指摘されているものの, 多種類の生物種によるバイオアッセイを同時に行うことは困難である。

そこで, 本論文は, 単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* が 2 本の鞭毛で遊泳する特徴をもつことから, 一種類の生物による生長, 鞭毛再生, 遊泳速度の異なるエンドポイント (図 1) による化学物質の生態毒性を多元的に評価する方法について検討を行ったもので, 全編 7 章からなる。

第 1 章は総論であり, 本研究の背景および目的とその意義について述べた。

第 2 章「生態毒性評価に関する既往の研究」では, 化学物質による環境汚染の現状, 生態毒性評価に関する既往の研究, *C. reinhardtii* を用いたバイオアッセイに関する既往の研究をまとめ, 研究課題の整理を行った。

第 3 章「*C. reinhardtii* のバイオアッセイの環境水への適用手法の構築」では, *C. reinhardtii* の鞭毛再生をエンドポイントとしたバイオアッセイの環境水への適用可能性を明らかにするために, 模擬環境

水を用いて鞭毛再生に対する塩分濃度やpHなどの環境要因を調べ、また難水溶性物質の毒性試験に助剤として用いる溶媒の種類、濃度の影響を調べた。その結果、① *C. reinhardtii* の鞭毛再生は pH6.5～8.5、および塩分 10% v/v（電気伝導率 = 570mS/m）以下の水質において影響を受けず、直接的に環境水の試験に適用可能なこと、②難水溶性物質の助剤としてメタノールを濃度 1% v/v 以下として用いることが適切であることが明らかとなった。

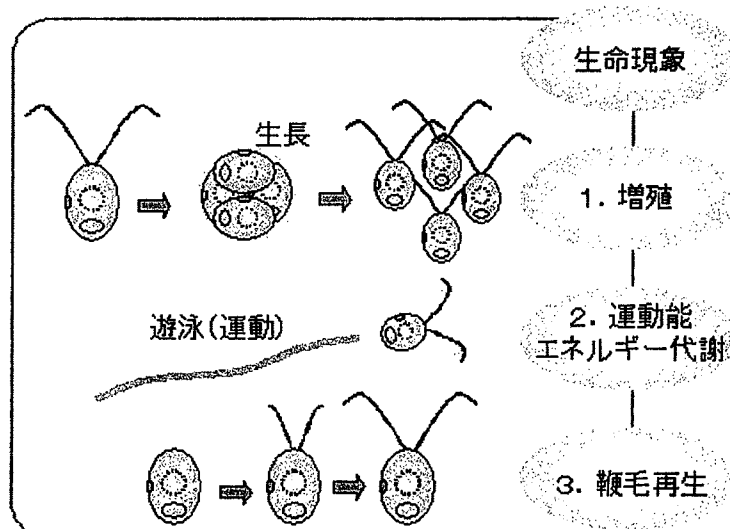


図1 *C. reinhardtii* のエンドポイントの特徴

第4章「アルキルフェノール類を用いた *C. reinhardtii* の生長、鞭毛再生、遊泳速度による多元的生態毒性試験の開発」では、疎水性を表す $\log Pow$ と生態毒性の関連性が知られていることを踏まえ、異なる $\log Pow$ を有するアルキフェノール類を試験化学物質として、*C. reinhardtii* の生長、鞭毛再生、遊泳速度による毒性評価を行うとともに、従来の藻類、甲殻類および魚類を用いた生態毒性試験（OECD テストガイドライン）結果と比較した。その結果、①アルキルフェノール類に対する *C. reinhardtii* の遊泳速度と生長はほぼ同等の影響濃度を示し、鞭毛再生は影響濃度が高い（感度が低い）ものの、*C. reinhardtii* の3つのエンドポイントによる毒性評価結果の間には良い相関関係があった（図2）。②アルキルフェノール類に対する *C. reinhardtii* の生長、鞭毛再生および遊泳速度の影響濃度は OECD テストガイドラインの影響濃度とよい相関が見られた（図2）。影響濃度からみた感度は、OECD テストガイドラインとほぼ同等かやや劣っていたが、感度は濃縮法を併用することで補うことができるため、*C. reinhardtii* の生長、鞭毛再生および遊泳速度をエンドポイントとした生態毒性評価試験は簡便かつ多元的な生態毒性試験として有用であることが明らかになった。

第5章「生理活性阻害部位が異なる農薬を用いた *C. reinhardtii* の鞭毛再生による多元的生態毒性試験の評価」では、アルキルフェノール類とは対照的に、生物に対する生理活性阻害部位が比較的明らかになっている化学物質の代表である農薬を用いて、*C. reinhardtii* の鞭毛再生が形態形成（アセンブリ）および鞭毛蛋白質合成の2つのプロセスを伴うことを利用して、*C. reinhardtii* の鞭毛再生をエンドポ

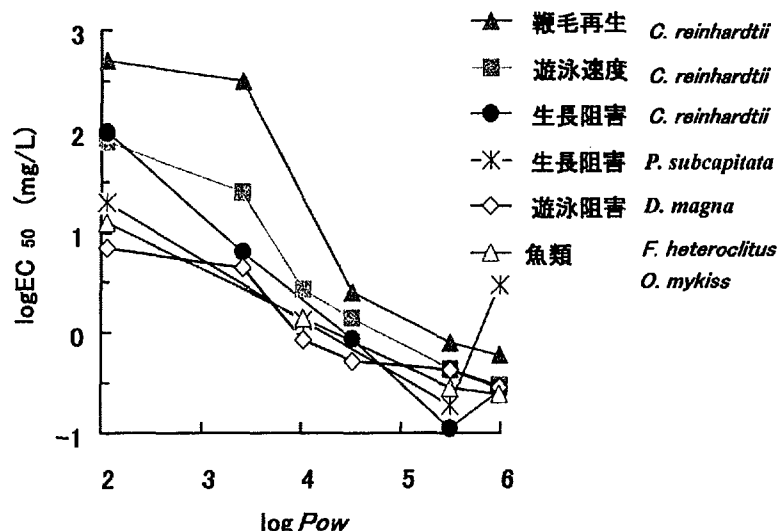


図2 アルキルフェノール類を対象物質とした生態毒性試験 logEC50 値と logPow の関係

イントとした多元的生態毒性の可能性を検討した。5種類の農薬によって異なる鞭毛再生パターンが示され、①鞭毛再生に影響しない(例, Diuron), ②初期鞭毛再生速度に影響→鞭毛縮合(例, Quinoclamine), ③初期鞭毛再生速度に影響→鞭毛再生速度が回復(例, Trifluralin), ④初期鞭毛再生速度に影響無し→鞭毛短縮(例, Thiobencarb), ⑤初期鞭毛再生速度に影響→鞭毛が殆ど伸長しないか伸長してもごく僅か(例, Carbary)の5つのパターンに分類された(図3)。このことから、*C. reinhardtii*の鞭毛再生という単一のエンドポイントであるにもかかわらず、評価時間を変えることによって多元的生態毒性評価が可能であることが明らかになった。

第6章「*C. reinhardtii*による多元的生態評価試験の環境水および水道原水への適用」では、水田地帯を流下する実際の河川水の*C. reinhardtii*の生長および鞭毛再生による生態毒性評価を行い、化学分析により検出された農薬(除草剤)から推定される毒性との比較を行うとともに、*C. reinhardtii*の鞭毛再生による水道原水および浄水の濃縮毒性評価を行い、水中に低濃度に存在する化学物質の潜在的な毒性の評価を試みた。

その結果、①河川水において*C. reinhardtii*の生長阻害は稲作期間中(5月末~6月中旬)に見られ、この時期は河川水中から高濃度の農薬が検出されたことから生長阻害は農薬によるものと推察された。②化学分析により検出された農薬(除草剤)から算出した生長率は*C. reinhardtii*の生長試験から求めた生長率よりも大きく、環境水においてはバイオアッセイによる総合的な評価が重要であることが明らかになった。この結果を踏まえ、定期的に農薬一斉分析が行われている水道原水および浄水を固相カー

トリッジにより濃縮・添加したところ（最終倍率 500 倍）、濃縮サンプルは採水月によって異なる鞭毛再生パターンを示し、濃縮によって水中に低濃度に存在する化学物質の潜在的な毒性を評価できることが明らかになった。

第 7 章では、本研究によって得られた知見を総括として示した上で、本研究分野の今後の課題、展望を述べた。

以上、本論文は、単細胞緑藻 *C. reinhardtii* という一種類の供試生物を用いて生長、鞭毛再生、遊泳速度の異なるエンドポイントから化学物質の多元的生態毒性評価を行う方法、および鞭毛再生においてそのパターンを用いた多元的生態毒性評価方法を提案し、その有用性を明らかにすることができた。

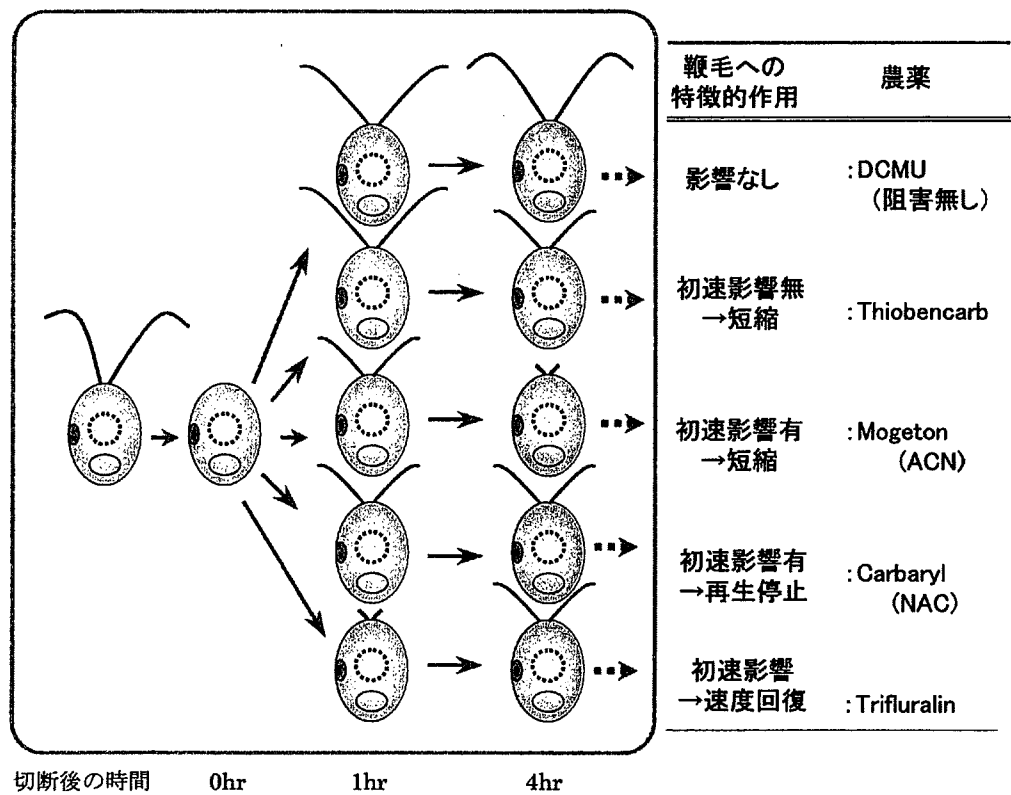


図 3 農薬に対する鞭毛再生パターン

論文審査結果の要旨

多種多様な化学物質の使用の結果、環境中から様々な化学物質が検出されており、それらの水圏生態系への影響が危惧されている。このため環境水における化学物質の生態毒性をバイオアッセイによって総合的に把握し、多元的に評価（異なる生物種、異なるエンドポイントによる評価）することの重要性が指摘されている。本論文は、単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* という一種類の供試生物を用いて生長、鞭毛再生、遊泳速度の異なるエンドポイントから化学物質の多元的生態毒性評価を行う方法について検討を行ったもので、全編7章からなる。

第1章は総論であり、本研究の背景および目的について述べている。

第2章では、化学物質による環境汚染の現状、生態毒性評価に関する既往の研究、*C. reinhardtii* を用いたバイオアッセイに関する既往の研究をまとめ、研究課題の整理を行っている。

第3章では、*C. reinhardtii* の鞭毛再生をエンドポイントとしたバイオアッセイの環境水への適用可能性を明らかにするために、鞭毛再生に対する塩分濃度やpHなどの環境要因、および難水溶性物質の毒性試験に助剤として用いる溶媒の種類、濃度の影響を解析している。これらは重要な知見である。

第4章では、その生態毒性がよく知られているアルキルフェノール類を試験物質として用い、*C. reinhardtii* の生長、鞭毛再生、遊泳速度による毒性評価を行った。そして、標準的な生態毒性試験方法（OECD 法）である藻類生長阻害試験、ミジンコ類遊泳阻害試験、魚類急性毒性試験の試験結果と良い相関があり、簡便に多元的な評価ができることを明らかにした。これは新しい重要な知見である。

第5章では、生理活性阻害部位が明らかになっている化学物質の代表である農薬を用い、*C. reinhardtii* の鞭毛再生という単一のエンドポイントでの多元的生態毒性評価の可能性を検討した。鞭毛再生が形態形成（アセンブリ）および鞭毛蛋白質合成の2つのプロセスを伴うことを利用し、さらに評価時間の影響を考慮することによって *C. reinhardtii* の鞭毛再生パターンを5つに分類できること、その鞭毛再生パターンから生理活性阻害作用が推定可能であり、多元的評価ができることを示した。これも新しい重要な知見である。

第6章では、水田地帯を流下する実際の河川水の生態毒性評価を行い、化学分析により検出された農薬（除草剤）から算出した生長率は *C. reinhardtii* の生長試験から求めた生長率よりも大きく、環境水においてはバイオアッセイによる総合的な評価が重要であること、および *C. reinhardtii* の鞭毛再生による水道原水および浄水の濃縮毒性評価を行い、濃縮によって水中に低濃度に存在する化学物質の潜在的な毒性を評価できることを明らかにしている。これらは有用な知見である。

第7章は、本研究の総括および展望である。

以上要するに本論文は、単細胞緑藻 *C. reinhardtii* を用いて生長、鞭毛再生、遊泳速度の異なるエンドポイントから化学物質の多元的生態毒性評価を行う新しい方法を提案したもので、環境工学の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士（工学）の学位論文として合格と認める。